

TUMORSEJTEK FENOTÍPUS-VÁLTOZÁSA TUMOR-SZTRÓMA SEJTFÚZIÓ HATÁSÁRA

PhD tézis

Dr. Kurgyis Zsuzsanna



Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2017

TUMORSEJTEK FENOTÍPUS-VÁLTOZÁSA TUMOR-SZTRÓMA SEJTFÚZIÓ HATÁSÁRA

PhD tézis

Dr. Kurgyis Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Németh István Balázs

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2017

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

- I. **Kurgyis Z***, Kemény LV*, Buknicz T, Groma G, Oláh J, Jakab Á, Polyánka H, Zänker K, Dittmar T, Kemény L, Németh IB. *Melanoma-Derived BRAF(V600E) Mutation in Peritumoral Stromal Cells: Implications for in Vivo Cell Fusion*. Int J Mol Sci. 2016 Jun 21;17(6). (*these authors contributed equally) IF: 3,226
- II. Kemény LV*, **Kurgyis Z***, Buknicz T, Groma G, Jakab Á, Zänker K, Dittmar T, Kemény L, Németh IB. *Melanoma Cells Can Adopt the Phenotype of Stromal Fibroblasts and Macrophages by Spontaneous Cell Fusion in Vitro*. Int J Mol Sci. 2016 Jun 2;17(6). (*these authors contributed equally) IF: 3,226

BEVEZETÉS

A primer tumor eltávolítása után gyakran figyelhető meg a tumor kiújulása, ami rutin diagnosztikai eszközökkel fel nem ismerhető, a tumor kiújulásáért felelőssé tehető sejtek jelenlétére utal. Erre egy lehetséges magyarázat, hogy a tumorsejtek fenotípusa megváltozik, és így standard diagnosztikai módszerekkel való felismerésük rendkívül nehézé válik. Korábbi tanulmányok eredményei alapján felvetődött, hogy a tumor-sztrómális sejtfúzió egy olyan lehetséges mechanizmus, amely által tumorsejtek mezenchimális fenotípusjegyeket vehetnek fel. Mindezek alapján az volt a hipotézisünk, hogy a peritumorális sztrómában olyan sztrómális fenotípusú sejtek vannak, amelyek a tumor kiújulásáért felelősek, és amelyek sejtfúzió útján jöhetnek létre.

CÉLKITŰZÉSEK

I. Munkacsoportunk célul tűzte ki, hogy melanomas betegek szövettani mintáit elemezve olyan a tumorok kiújulásában szerepet játszó sejteket azonosítsunk a peritumorális sztrómában, amelyek tumor marker expressziója eltér a primer tumorétól, felismerhetetlenné téve ezen sejteket a rutin patológiai diagnosztika számára.

II. Ezenkívül célunk volt annak vizsgálata is, hogy tumor és sztrómális sejtek fúziója által létrejöhetnek-e ilyen sejtek *in vitro*.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúra

A humán melanoma sejtvonalakat Buzás Krisztina bocsájtotta rendelkezésünkre. A perifériás vérből nyert monocitákat CD14+ mágneses izoláció útján szeparáltuk, míg a humán dermális fibroblasztok plasztikai sebészeti beavatkozásokon átesett egészséges önkéntesek mintáiból származnak. A melanoma sejtvonalakat CellTracker Orange-dzsal, míg a fibroblasztokat illetve a frissen izolált monocitákat CellTracker Greennel jelöltük, majd 24 órán át kokultúrában tenyésztettük.

Spontán fúzió detektálása

A jelölt kokultúrákat fixálást követően konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltuk, majd három dimenziós rekonstrukciót készítettünk a kettősen pozitív sejtekről.

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A hibrid sejtek pozíciójának rögzítését követően a jelölt kokultúrákban a fluoreszcens sejtmakereket “kiégettük”, majd a sejtek X és Y kromoszómáit újabb fluoreszcens markerekkel jelöltük, amelyeket szintén konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltunk.

Fúziós ráta vizsgálata

A fúziós rátát fixált kokultúrákban flow citométerrel vizsgáltuk. Feltételeztük, hogy kettősen pozitív sejtek nem kizárólag fúzió útján jöhetnek létre, ezért transwell kultúrákat is használtunk, amelyekben a transwell a monocitákat a melanoma sejtektől elválasztja, így jelölt, elhalt sejtrészecskék igen, de élő, egész sejtek nem érintkeznek egymással.

Immunofluoreszcens festések

A fixált kokultúrák festéséhez MART1 és CD68, a rutin patológiai diagnosztikában is használt antitesteket, illetve a megfelelő izotípus kontroll antitesteket használtunk.

Szövettani minták és BRAF mutáció meghatározása

$N = 11$ BRAF^{V600E} és $n = 5$ BRAF^{WT} melanomas beteg szövettani mintáit elemeztük BRAF^{V600E} fehérje kifejeződésre. A genetikai analízisekhez (cobas® 4800 BRAF^{V600} Mutation Test) $n = 11$ BRAF^{V600E} és $n = 8$ BRAF^{WT} melanomás beteg mintáit használtuk fel.

Immunhisztokémia

A szövettani metszetek egyszeres és kettős festésére MART1, SMA, CD68 és BRAF^{V600E} antitesteket, illetve Bond Polymer Refine Detection Kitet és ChromoPlex 1 Dual Detection Kitet használtuk.

Lézer mikrodisszekció és BRAF^{V600E} allél-meghatározás

Kettősen festett szövettani mintákból 30-100 sejteket disszáltunk, majd a minták emésztését követően a BRAF^{V600E} allélfrekvenciát TaqMan® PCR-rel határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

BRAF^{V600E} fehérje kifejeződik a peritumorális sztróma szubpopulációiban

1. Melanomás betegek szövettani metszetein végzett MART1–*BRAF^{V600E}* kettős festés segítségével kimutattuk, hogy a *BRAF^{V600E}* szomatikus mutáció a melanoma sejteken kívül peritumorális fibroblaszt és makrofág morfológiájú sejtekben is expresszálódik fehérje szinten.
2. A vizsgált *BRAF^{WT}* melanomás szövetminták egyikében sem találtunk peritumorális *BRAF^{V600E}* pozitivitást.

Egyes peritumorális fibroblasztok és makrofágok hordozzák a melanoma-specifikus BRAF^{V600E} mutációt primer melanoma, melanoma metasztázis és tumor-mentes re-excíziós mintákban

1. Primer és metasztatikus *BRAF^{V600E}* melanoma szövettani metszetekből lézer mikrodisszekcióval izolált MART1–SMA+ fibroblaszt morfológiájú, és MART1–CD68+ makrofág morfológiájú sejtek allél-specifikus PCR analízise kimutatta a *BRAF^{V600E}* allél jelenlétét ezekben a sejtekben 0,5% és 30% közötti allélfrekvenciával.
2. A mutáns allél ezen kívül kimutatható volt egy szövettanilag tumormentesnek ítélt reexcíziós mintából izolált makrofág fenotípusú sejtjeiben is. A beteg melanomája később ugyanezen lokalizációban kiújult.
3. *BRAF^{WT}* melanomás mintákban nem találtunk *BRAF^{V600E}* allélt hordozó sejteket.
4. A tumorok kiújulásáért felelőssé tehető sejtek jelenlétét a peritumorális sztrómában alátámasztja, hogy a kisebb excíziós szegéllyel operált melanomás betegeinkben gyakrabban alakult ki helyi recidiva, mint a széles szegéllyel operáltakban.

Melanoma sejtek spontán fúzionálnak fibroblasztokkal és monocitákkal *in vitro*

1. Különböző melanoma sejtvonalak és dermális fibroblasztok illetve frissen izolált monociták kokultúrájában 24 óra elteltével spontán létrejött hibrid sejtek voltak azonosíthatóak konfokális mikroszkóppal.
2. FISH segítségével a sejtfúziót genetikai szinten is megerősítettük,
3. A kettősen pozitív sejtek keletkezését flow citometriával is kimutattuk. 24 óra után a melanoma–monocita kokultúrák fúziós rátáját 0,5% és 4,39% közöttinek találtuk.

A hibrid sejtek morfológiájuk és fenotípusuk alapján megkülönböztethetetlenek a sztrómális sejtektől

1. Megvizsgálva a hibridsejtek méretét és morfológiáját, a vizsgált melanoma sejtvonaltól függetlenül a legtöbbjük megkülönböztethetetlen volt a fibroblasztoktól illetve a monocitáktól.
2. A hibridsejteknek egy vagy két magjuk volt, többmagvú hibridsejteket nem figyeltünk meg.
3. A rutin patológiai diagnosztikában használt fenotípusos markereket vizsgálva találtunk CD68+ melanoma–makrofág hibridsejteket, illetve MART1– melanoma–makrofág és melanoma–fibroblaszt hibrideket is.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kimutattuk, hogy melanoma sejtek spontán fuzionálnak fibroblasztokkal és monocitákkal *in vitro*, és a keletkezett hibrid sejtek morfológiailag és fenotípus alapján megkülönböztethetetlenek a sztrómális sejtektől. Ezenkívül $BRAF^{V600E}$ melanomaszövetmintákban a melanoma-specifikus $BRAF^{V600E}$ mutációt genetikai és fehérje szinten expresszáló peritumorális sejteket azonosítottunk mind primer, mind metasztatikus melanomában, illetve egy később lokális recidívában szenvedő beteg szövettanilag tumormentesnek ítélt mintájában is.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a tumor-sztrómális sejtfúzió olyan hibrid sejtek kialakulásához vezethet, amelyek sztrómális fenotípussal rendelkeznek, és így rutin patológiai diagnosztikai módszerekkel felismerhetetlenek. Eredményeink ezáltal felhívják a figyelmet a genetikai vizsgálatok és a mutáció-specifikus antitestek használatának fontosságára a tumor kiújulásában lehetséges szerepet játszó sejtek azonosításában, és közvetve a betegség lefolyásának és betegek túlélésének előjelzésében is.